

CE

Free Estriol ELISA

KAPD1612

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium


LOT : 140127/1



FREE ESTRIOL ELISA

Enzymeimmunoassay for the quantitative measurement of Free Estriol in human serum

KAPD1612

IN VITRO DIAGNOSTIC USE



DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DIAsource Free Estriol ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of free estriol (unconjugated estriol) in serum during the second half of pregnancy.
This kit is not intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

1.2 Summary and Explanation

Estriol (E3) is the major estrogen formed by the fetoplacental unit during pregnancy. Unconjugated E3 passes through the placenta into the maternal circulation, where it is rapidly converted into glucuronide and sulfate derivatives to facilitate its excretion. The half-life of estriol in the maternal bloodstream is only 20-30 minutes. Its measurement, therefore offers a convenient and quick evaluation of current fetal status. Plasma estriol levels increase steadily throughout pregnancy and most rapidly during the third trimester (28-40 weeks). A sudden decrease in fetoplacental E3 production will result in a rapid fall in unconjugated E3 in the maternal serum. There are several potential advantages to measuring unconjugated E3 rather than total serum or urinary E3. Unconjugated estriol levels are free from effects related to maternal renal or hepatic disease, and are not altered by the administration of certain antibiotics. Unconjugated E3 more accurately reflects fetal outcome in diabetic pregnancies - and since no hydrolysis of unconjugated E3 is required, a more rapid turnaround for the test result is possible.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DIAsource Free Estriol ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.
The microtiter wells are coated with a polyclonal [rabbit] antibody directed towards an antigenic site on the Estriol molecule. Endogenous Estriol of a patient sample competes with an Estriol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.
The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Estriol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Estriol in the patient sample.

3 PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H_2SO_4. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.

- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
  Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource ImmunoAssays S.A..

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1. [microplate symbol]	12x8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with a anti-Estriol antibody (polyclonal).
2. CAL | N	N = 0 to 5, 6 vials, 1 mL, ready to use; See exact values on vial labels
3. CONTROL | N	Control Low & High, 2 vials, 1 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. Ag | HRP	1 vial, 14 mL, ready to use; Estriol conjugated to horseradish peroxidase; Contain non-mercury preservative
5. CHROM | TMB	1 vial, 14 mL, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
6. STOP | SOLN	1 vial, 14 mL, ready to use; contains 0.5M H2SO4. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. WASH | SOLN | CONC	1 vial, 30 mL (40X concentrated); see „Preparation of Reagents“.

* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Note: Additional Calibrator 0 for sample dilution is available upon request

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm).
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled water.
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.
Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.
Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution
Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.
The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DIAsource ImmunoAssays S.A. has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations

5 SPECIMEN

Serum should be used in this assay.
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.
Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:
Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 4 days at 2-8°C prior to assaying.
Specimens held for a longer time (least one year) should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and reassayed as described in the Assay Procedure.
For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.
<u>Example:</u>
a) Dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly)
b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly).

6 TEST PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Assay Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **10 µL** of each **Calibrator, control** and **samples** <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
   Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
   Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
   Important note:
   The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450±10 nm** with a microtiter plate reader.
   It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit.
   4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrators		Optical Units (450 nm) OD
Calibrator 0	(0.0 ng/mL)	1.79
Calibrator 1	(0.3 ng/mL)	1.48
Calibrator 2	(1.2 ng/mL)	1.18
Calibrator 3	(4.0 ng/mL)	0.81
Calibrator 4	(15.0 ng/mL)	0.52
Calibrator 5	(40.0 ng/mL)	0.38

7 EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

7.1 Normal healthy adults

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DIAsource Free Estriol ELISA the following values are observed:

Population	Valid N	5% Percentile [ng/mL]	95% Percentile [ng/mL]
Males	42	0.146	0.573
Females (not pregnant)	43	0.057	0.822

7.2 Values during pregnancy

Week of gestation p.m.	Expected range (ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Week of gestation p.m.	Expected range (ng/mL)	Twin pregnancy (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

CLINICAL SIGNIFICANCE

The measurement of Estriol (E3) in body fluids has routinely been used for the monitoring and management of fetal well-being, particularly in the high-risk pregnant patient. The concentration of E3 in plasma increases gradually during the first 20 weeks gestation and more rapidly during the third trimester. Since the ranges for normal and abnormal serum conjugated E3 are wide and overlap considerably, a single E3 determination is of little value. The patient should be monitored frequently to establish any individual trend.

Consistently low levels or a sudden and continual decrease of serum E3 during the third trimester is highly indicative of fetal distress and possibly intrauterine death. When such observations are made, the status of the fetus should be assessed by alternative methods.

Interpretation of serum unconjugated E3 levels should be made in conjunction with other clinical tests or diagnostic procedures such as amniocentesis and ultrasound. Subnormal E3 levels may also be observed in patients being administered certain antibiotics or corticosteroids or in patients with impaired maternal hepatic function.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DIAsource ImmunoAssays S.A. directly.

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.075 – 40 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

added steroid	concentration of steroid	OD (450 nm)	Measured concentration
Estriol (E3)	40 ng/ml	0,39	39,67 ng/ml
Testosterone	16 ng/ml	1,758	n.d.
Estradiol (E2)	2 ng/ml	1,579	n.d.
Estrone (E1)	2 ng/ml	1,712	n.d.
Cortisol	800 ng/ml	1,775	n.d.

n.d. = non detectable

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean minus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator 0* and was found to be 0.075 ng/mL.

9.4 Precision

9.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	2.1	4.7
2	20	6.2	3.2
3	20	14.6	3.0

9.4.2 Inter Assay Variation

The inter assay variability (three different kit lots) is shown below:
The between-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	12	2.1	4.6
2	12	5.7	8.5
3	12	13.3	9.5

9.5 Recovery

Recovery of the DIAsource ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different patient sera containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the calibration curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [ng/mL]		1.32	3.59	7.79
Average Recovery		100.8	101.8	106.9
Range of Recovery [%]	from	89.0	92.3	98.5
	to	103.8	109.8	112.3

9.6 Linearity

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [ng/mL]		2.63	7.18	15.58
Average Recovery		98.2	99.7	100.2
Range of Recovery [%]	from	86.3	90.4	96.4
	to	107.9	106.8	103.7

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.
Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.125 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Free Estriol in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.
The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.
Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.
The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.
Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

Bashore, R.A., Westlake, J.R. Plasma unconjugated estriol values in high risk pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol., June 15, 1977, p371-380

Revision date : 2014-01-27



FREE ESTRIOL ELISA

Enzymeimmunoassay for the quantitative measurement of Free Estriol in human serum

KAPD1612

IN VITRO DIAGNOSTIC USE



DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DIAsource Free Estriol ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Estriol libre en suero.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro.*

Este kit no esta destinado por ser utilizado para la evaluación de riesgo de trisomia 21.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit **DIAsource Free Estriol ELISA** es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula Estriol. En las muestras de los pacientes Estriol compite con un conjugado Estriol -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Estriol en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Estriol libre en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H_2SO_4 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DIAsource ImmunoAssays S.A. Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de las guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1.		***Microtiterwells*** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- Estriol (policlonal).
2.	CAL | N	***Calibrador (Calibrador 0-5),*** 6 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 - 0.3 - 1.2 - 4 - 15 - 40 ng/mL
3.	CONTROL | N	***Control Low & High***, 2 viales, 1 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante.
4.	Ag | HRP	***Enzyme Conjugate*** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Estriol conjugado con la Peroxidasa de rábano;; Contiene conservante sin mercurio.
5.	CHROM | TMB	***Substrate Solution*** *(Solución de sustrato)*, 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6.	STOP | SOLN	***Stop Solution*** *(Solución de parada)*, 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H_2SO_4, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
7.	WASH | SOLN | CONC	***Wash Solution*** *(Solución de lavado)*, 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver “Preparación de los Reactivos”.

* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Nota: Se puede solicitar el *Calibrador 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.
Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.
Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution
Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.
La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto.

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DIAsource ImmunoAssays S.A. no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero.
No usar muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas.
Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:
Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 4 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.
Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (al menos un año) han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el calibrador mas concentrado, ha de diluirse con *Calibrador 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.
Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:
a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente)
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de calibradors.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **10 µL** de cada ***Calibrador, Control*** **y muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de ***Enzyme Conjugate*** a cada pocillo.
   Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutes** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
   Lavar los pocillos **4 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
   Nota importante:
   La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **100 µL** de ***Substrate Solution*** a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutes** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de ***Stop Solution*** a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*..

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de calibradors, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva calibrador mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada calibrador frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de calibradors. Las muestras con concentraciones superiores al mayor calibrador han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Calibrador Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Calibrador		Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0	(0.0 ng/mL)	1,79
Calibrador 1	(0.3 ng/mL)	1,48
Calibrador 2	(1.2 ng/mL)	1,18
Calibrador 3	(4.0 ng/mL)	0,81
Calibrador 4	(15.0 ng/mL)	0,52
Calibrador 5	(40.0 ng/mL)	0,38

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

7.1 Valores con adultos aparentemente sanos

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DIAsource Free Estriol ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	N válido	Percentil 5% [ng/mL]	Percentil 95% [ng/mL]
Hombres	42	0.146	0.573
Mujeres	43	0.057	0.822

7.2 Valores durante embarazo

(p.m. = post menstruationem)

Semanas de embarazo p.m.	(ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Semanas de embarazo p.m.	(ng/mL)	embarazo con gemelo (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

TENER EN CUENTA:
Para importancia clínica consultar el manual de usuario en inglés (Capítulo 7: EXPECTED VALUES)

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control ser recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.
Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.
Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.
Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.
En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DIAsource ImmunoAssays S.A. directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,075 – 40 ng/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones calibrador de veinte (20) réplicas del *Calibrador 0* y resultó ser 0,075 ng/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.125 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influencian los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Estriol libre en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros calibradors y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En cado de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DIAsource ImmunoAssays S.A.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidad cualquier reclamación de reposición.
Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

Fecha de revisión: 2014-01-27

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Símbolos utilisados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Codigo de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado